

A CA-FÜGGŐ K(RB) TRANSZPORT KIMUTATÁSA EMBERI LIMFOCITÁKBAN

SZÁSZ ILMA, SARKADI BALÁZS és GÁRDOS GYÖRGY

Országos Haematológiai és Vértranszfúziós Intézet, Budapest

KAPLAN és munkacsoportja (QUASTEL, KAPLAN 1970, KAPLAN 1977), valamint AVERDUNK (1976) kimutatták, hogy a limfociták konkanavalin A, ill. fitohemagglutinin stimulációjakor a K, Na pumpa aktiválódik. NEGEN-DANK és SHALLER (1977) arról is beszámolt, hogy konkanavalin A stimulációra az emberi limfociták K-szintje 83–85%-ára csökken, míg a Na-szint gyakorlatilag változatlan. A K-vesztés nem az agglutináló hatással párhuzamos és létrejöttéhez komplement nem szükséges. Felvetik azt a lehetőséget is, hogy a K, Na pumpa aktiválásához e transzport folyamat eredményeképpen megnövekedett külső K-szint jelentősen hozzájárulhat.

FREEDMAN 1979-ben egér lép limfocitákon kimutatta, hogy konkanavalin A hatásra gyors Ca-influx lép fel, amelyet dbcGMP előinkubálás növel, dbcAMP előinkubálás csökkent.

Magától értetődő volt számunkra, hogy megvizsgáljuk: vajon a szelektív K-vesztés nincs-e oki összefüggésben a Ca-felvételével, másszóval a limfociták nem rendelkeznek-e az intracelluláris Ca-szint által aktiválható K-transzport mechanizmussal, az ún. Gárdos-effektussal.

Módszerek

100–400 ml friss emberi vér limfocitáit izoláltuk. 10 g/dl Dextran T 250-et 1 : 20 arányban adtunk a vérhez, a vörösvérsejteket ülepitettük, a felülúszót leszívtuk és sejtjeit centrifugáltuk (1000-es fordulatszámmal 15 percig). A sejteket 0,5 g/dl albumin tartalmú Hanks oldatban szuszpendáltuk és ~0,1 g vasparral 37 °C-on 30 percig inkubáltuk. Ezután a szuszpenziót egy 1,075 fajsúlyú Ficoll-Uromiro grádiensen centrifugáltuk (2500-as fordulatszámmal 15 percig). A vörösvérsejtek és a fagociták kiülepedtek, a limfociták, jelentős trombotocita szennyeződéssel, a határretegen helyezkedtek el. A sejteket Hanks-oldatban háromszor 1000-es fordulatszámmal 15 percig mosva a trombotocitákat eltávolítottuk. A limfociták több mint 96%-a tripánkéék kizárásos teszt alapján életképes volt. Szuszpendáló közegként a „minimális esszenciális médium” egy módosítását használtuk (5 mM glukóz, 4 mM l-glutamin, 0,2–1,8 mM CaCl₂,

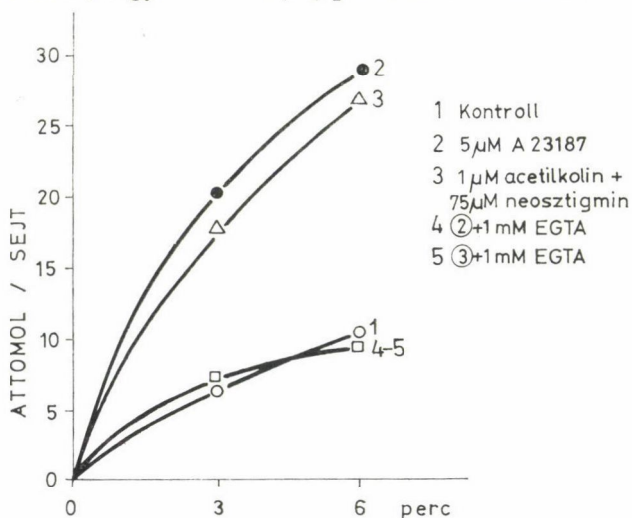
Tris-HCl, pH 7,4, 0,155 M NaCl-ban), ^{86}Rb -töltési kísérletek során 100 E/ml penicillin G és 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sztreptomocinnal kiegészítve.

A ^{86}Rb és ^{45}Ca -felvételi kísérletek során a limfocitákat a) 0,16 M KCl-ben oldott 0,7 M szaharózpárnán való centrifugálással választottuk el a közegtől, s a cső alján összegyűlt sejteket tömény hangyasavban homogenizáltuk a rádióaktivitás mérése előtt, b) 0,6 μm pórusátmérőjű Sartorius cellulózacetát membrán szűrő segítségével szeparáltuk, hideg mosóoldattal háromszor mostuk, majd a szűrőn lévő sejtek rádióaktivitását szcintillációs folyadékban mértük. Ez utóbbi módszer bizonyult kielégítőbbnek.

^{86}Rb -efflux kísérletekben a centrifugálással elválasztott felülúszó és sejtüledék rádióaktivitását egyaránt megmértük szcintillációs üreges kristályban (Biogamma, Beckman).

Eredmények és megbeszélés

Vörösvérsejten végzett munkáinkból (GÁRDOS és mtsai 1975, SZÁSZ és mtsai 1978) ismert, hogy a Ca-függő K-transzport kétirányú és kívülről hozzáadott ^{86}Rb -al való inkubálás kezdeti időszakában egy gyors izotópfelvétel mérhető. Limfocitákon az aktív (és aktiválható) K, Na-pumpa működését ouabainnal gátoltuk, hogy a K-pumpa által végrehajtott Rb-akkumulációt kiiktassuk. 1. ábránkon látható, hogy az első 6 (10) percben a Ca-ionofór A23187, valamint

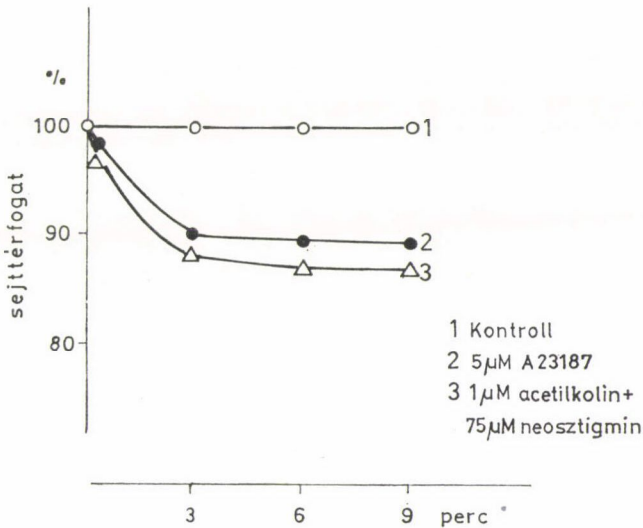


15 · 10⁶/ml sejt MEM (=Minimális Esszenciális Medium^m)-ban
 $[\text{Ca}]_0 = 0,2 \text{ mM}$
 $[\text{Rb}]_0 = 1,5 \text{ mM}$
 OUABAIN = 0,05 mM
 37°C

1. ábra. Rb-felvétel emberi limfocitákban

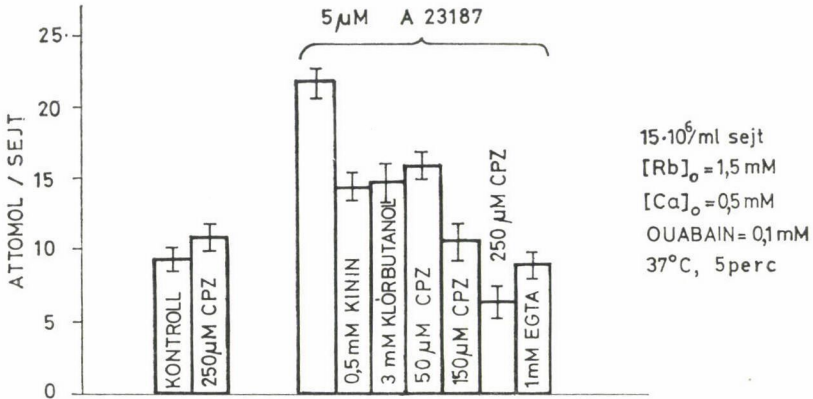
neosztigmin kolinészteráz gátló jelenlétében alkalmazott $1\mu\text{M}$ acetilkolin hatására Ca-tartalmú közegben jelentősen megnő a Rb-felvétele, míg a közeg kalciumának kelátkomplexbe vitelekor ez a jelenség nem jön létre. Egyidejű ^{22}Na -felvétel fokozódást ($0,155\text{ M}$ kolinklorid „alapú” közegben) nem észleltünk. Ilyenkor az elektroneutralitás fenntartása várhatóan kísérő klorid (és víz) veszteséggel — s következményes sejt térfogatsökkenéssel — jár. 2. ábránk mutatja, hogy a Medicor Haematologiai Automatán mérve a limfociták térfogatát (a vörösvérsejtnyomokat cetrimid tartalmú hemolizáló oldattal eltüntetve), az a transzport jelenséggel párhuzamosan csökkent. A sejtek inhomogén módon reagáltak (a készülék egyes „rekeszei” közti megoszlási arányuk változott). 3. ábránk mutatja, hogy az A23187 által fokozott ouabain-inszenzitív Rb-influx gyógyszerérzékenysége igen hasonló a vörösvérsejtek Gárdos-effektusáéhoz (Szász és mtsai 1978), csak ionfór jelenlétében a CPZ $50\mu\text{M}$ -nál magasabb koncentrációi már károsító hatásúak. Rövid időtartamú kísérletben a külső Ca nélkülözhetetlen, a Ca-ionofór a belső raktárakat még nem éri el és azokból nem mobilizál Ca-ot (relatív magas ionofór koncentráció esetében sem).

^{86}Rb -töltött limfociták Rb-effluxában is jól lehetett figyelni az A23187 indukált fokozott Rb-kiáramlást, különösen, ha a reakkumulációt



$4 \cdot 10^6/\text{ml}$ sejt MEM-ben
 $[\text{Ca}]_o = 0,2\text{mM}$
 $[\text{K}]_o = \emptyset$
 37°C
kezdeti sejttérfogat: 138 fl

2. ábra. A23187, ill. acetilkolinnal stimulált limfociták térfogat változása

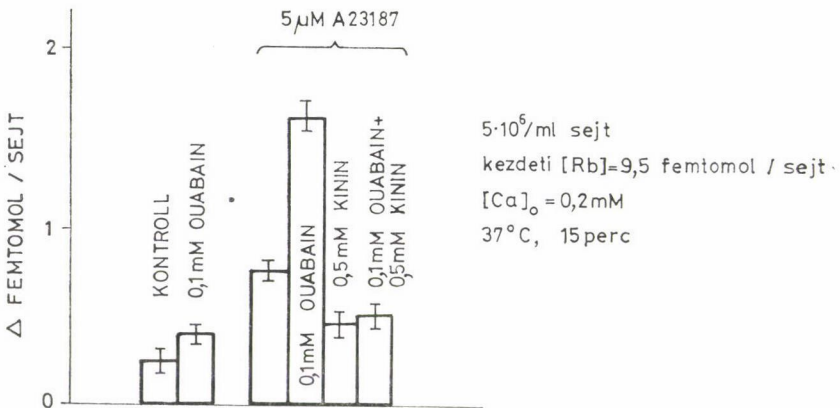


3. ábra. A23187 + Ca hatása a Rb-felvételre limfocitákban

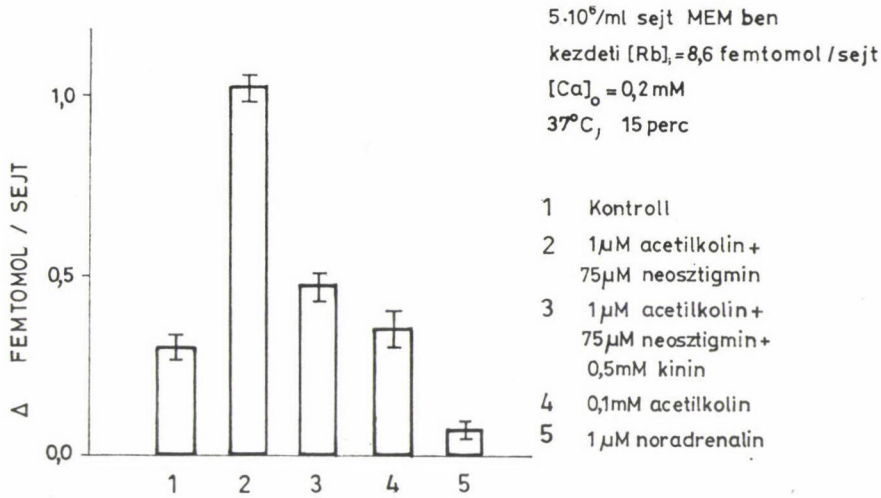
ouabainnal gátoltuk (4. ábra). 0,5 mM kinin (amely a K, Na-pumpát magasabb — 2,5 mM — koncentrációban gátolja) ezt a kiáramlást megszüntette. Lehetséges tehát, hogy a K, Na pumpa aktiválódásához a Ca-függő K-kiáramlás révén a sejt környezetében megemelkedett K-koncentráció hozzájárul.

HADDEN és mtsai (1975) kimutatták, hogy egér limfocitákban és lépsejteken acetilkolin kis koncentrációi cGMP szint emelkedést és DNS szintézis fokozódást hoznak létre. 5. ábránk mutatja, hogy emberi limfocitákban 1—100 µM acetilkolin kiváltotta a Ca-függő Rb-transzportot. 1 µM acetilkolin hatását a kolinészteráz gátló neosztigmin jelentősen fokozta; 100 µM acetilkolin önmagában csak kismértékben volt hatásos. Feltűnő volt 1 µM noradrenalin Rb-transzport *csökkentő* hatása.

Mivel a K-permeabilitás növekedése a sejt membránpotenciálját negatív irányba tolja el (a kisebb permeabilitású kísérő anionok „késése” miatt), várható, hogy ez a hatás a kationoknak, s ezen belül magának a Ca-nak a felvételét

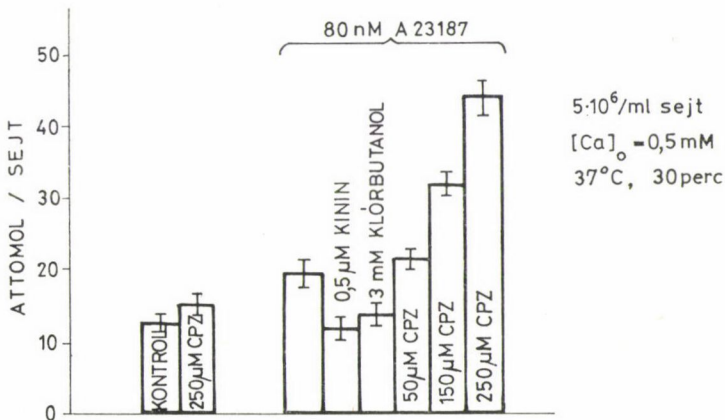


4. ábra. A23187 + Ca hatása a ⁸⁶Rb-kiáramlására limfocitákban



5. ábra. Különböző stimulusok hatása ⁸⁶Rb-kiáramlására limfocitákban 0,1 mM ouabain jelenlétében

is elősegíti. Ezt mutatja 6. ábránk. Látható, hogy a K(Rb) efflux kinines, klórbutanos gátlása révén megakadályozva a hiperpolarizációt a Ca-felvétel is csökken. A Gárdos effektus gátlószerei közül a CPZ-nél ezt a hatást nem észleltük, de mivel ez a vegyület jólismert kalmodulin antagonistá, valószínűleg a Ca-pumpa aktiválódásának megakadályozása révén emeli a Ca-szintet. (Magasabb koncentrációi pedig sejt-károsító hatásúak.) Az a tény, hogy a Ca-felvétel sebességét a Ca-függő K-transzport kialakulása befolyásolja arra utal, hogy egyik szerepe éppen az inger hatásra fellépő „korai Ca-influx” fokozása, amplifikációja lehet.



6. ábra. Drogok hatása limfociták A23187-indukált Ca-felvételére

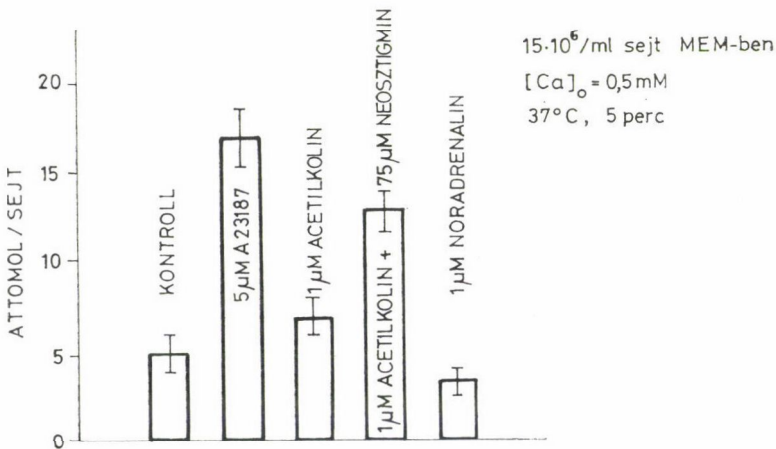
Acetilkolinos, ill. noradrenalinus rendszerekben a Ca-felvétel jó párhuzamot mutatott az előzőekben bemutatott K(Rb) permeabilitás változásokkal (7. ábra). Acetilkolinnal nagyobb mérvű Ca-felvétel fokozást nem sikerült elérnünk, mint amilyen a Ca-pumpa 0,2 mM LaCl_3 -al való gátlásakor jelentkező Ca-influx. Ezek az adatok felvetik a kérdést, vajon az acetilkolin-noradrenalin típusú anyagok csak a Ca-pumpa működés (cAMP-cGMP függő) szabályzásán keresztül változtatják-e meg a K(Rb) permeabilitást.

Meg kell jegyeznünk, hogy vérkészítménygyártás során 24 óráig sterilen tárolt fehérvérsejt lepedékből preparált limfocitákban A23187 vagy acetilkolin hozzáadása nélkül is kimutatható volt a kinin, klórbutanol-érzékeny K-transzport. Igen valószínű, hogy ilyenkor a belső Ca-raktárakból felszabadult Ca a sejtplazma Ca-koncentrációjának emelése révén aktiválta a plazmamembrán specifikus K-transzportútját. Hasonló jelenséget trombocita készítményeken is észleltünk.

Összefoglalás

Emberi perifériás vér limfocitáin sikerült kimutatnunk a Ca-függő, kinin, klórbutanol, CPZ érzékeny K-transzport (az ún. Gárdos effektus) létezését. Feltételezhető, hogy ez a folyamat a stimulált limfocitában a K, Na pumpa aktiválódásához, és a Ca-felvétel fokozódásához hozzájárul.

Ez a munka a 6-03-0306-01-1/Gá téma keretében az Egészségügyi Minisztérium támogatásával készült. A lelkesedéssel és szakértelemmel végzett technikai asszisztenciáért András Lászlónét és Dr. Sarkadi Ádámnét illeti köszönet.



7. ábra. Limfociták Ca felvétele különböző stimulusok hatására

RÖVIDÍTÉSEK

cAMP	= ciklikus adenzin-3', 5'-monofoszfát
cGMP	= ciklikus guanozin-3', 5'-monofoszfát
CPZ	= klórpomazin
dbcAMP	= dibutirilcAMP
dbcGMP	= dibutirilcGMP
EGTA	= etilénlikol-bis/2-aminoetiléter/-N,N'-tetraacetát
MEM	= minimális esszenciális médium

IRODALOM

- AVERDUNK, R.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **70**, 101 (1976).
- FREEDMAN, M. H.: *Cell Immunol.* **44**, 290 (1979).
- GÁRDOS, G., SZÁSZ, I., SARKADI, B.: *FEBS Proceedings* **35**, 167 (1975).
- HADDEN, J. W., JOHNSON, E. M., HADDEN, E. M., COFFEY, E. G., JOHNSON, L. D.: *Proceedings of „9th Leukocyte Culture Conference.”* (Szerk.: A. Rosenthal). 237 o. Acad. Press, Inc. New York, N. Y. (1975).
- KAPLAN, J. G.: „Regulatory mechanisms in lymphocyte activation” (Szerk.: D. O. Lucas) 51 o. Acad. Press, Inc., New York, San Francisco, London, (1977).
- NEGENDANK, W., SHALLER, C.: „Regulatory mechanisms in lymphocyte activation” (Szerk.: D. O. Lucas) 429 o. Acad. Press, Inc., New York, San Francisco, London, (1977).
- QUASTEL, M. R., KAPLAN, J. G.: *J. Cell Biol.* **47**, 164a (1970).
- SZÁSZ, I., SARKADI, B., GÁRDOS, G.: *Acta Biochem. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **13**, 133 (1978).